

日本女子大学紀要 理学部 第13号 (2005)

ポリカーボネート容器から溶出するビスフェノールAの LC/APIMSによる溶出試験

高橋 泰子, 関 真由美, 関 陽子, 細井理恵子
日本女子大学理学部物質生物科学科

(2004年10月26日受理)

要 旨 新品ポリカーボネート (PC) 容器から溶出するビスフェノールA (BPA) の高速液体クロマトグラフィー/大気圧イオン化質量分析法 (以下LC/APIMS とする) による溶出試験を行った。ネガティブモード電解噴霧イオン化 (ESI) 法は大気圧化学イオン化 (APCI) 法より感度はよくないが, BPA に対してS/N 比が高かったので選択した。検出限界濃度は2 ppbであった。24時間, 25°C 条件下の BPA 標準溶液添加回収実験における回収率は約87%であった。PC 容器から *n*-ヘプタンに溶出する BPA 溶出量は溶出時間, 温度, ナイフによる傷の数が増すと増えるのが見られた。特に温度が25°C から 5°C 上がっただけで大きく増加し, 温度の影響の大きいことが窺える。51個の PC 容器サンプル中 BPA の溶出濃度を 2 ml/ 1 cm² あたりに換算した濃度は溶出試験規格値の 2.5 ppm を超えるものはなかった。

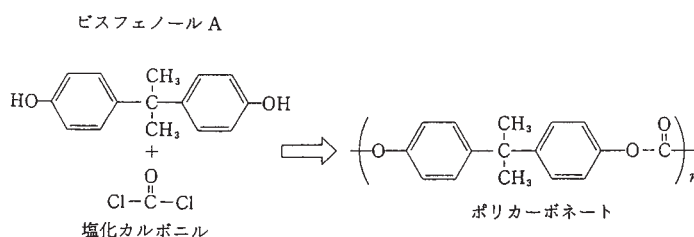
キーワード : LC/APIMS, ポリカーボネート容器, ビスフェノールA, 溶出試験, ESI イオン化法

I. 緒 言

1996年に出版された野生生物学者 Colborn らの書いた“*Our stolen future*”¹⁾は野生生物の異変が環境中に放出された化学物質によって起こっていることを多くの実例を示し, 内分泌かく乱物質の怖さを世界中にしらしめた。化学物質が動物体内の正常なホルモン作用を攪乱することによって, 生殖機能を阻害する可能性が指摘されている²⁾。今日我々は膨大な数のプラスチックをはじめとした化学物質に囲まれた生活をしており, それらの化学物質は日々の暮らしの中で不可欠なものとなっている。日常品プラスチックから溶出する内分泌かく乱作用が認められている物質についての分析報告は多い³⁻⁵⁾。忘れてならないのは下水処理水中や河川底泥中や廃プラスチックからの汚染, 水環境物質の問題もある⁶⁾。内分泌かく乱物質の一つとして疑われているビスフェノールA (BPA) はポリカーボネート (PC) やエポキシ樹脂の原料として広い用途で用いられている。PCは透明性に優れ, 耐衝撃性, 耐熱性がよく, 熱湯使用にも耐えることからオープンレン

ジによる加熱が可能などますますその用途を広げている。そのためBPAの環境への放出, 食品への移行, さらにヒトへの暴露およびその暴露量における内分泌攪乱作用の有無に関心が集まっている。

PCはBPAと下図のように塩化カルボニルとの重合あるいはジフェニルカーボネートとの重合反応によって合成される。



ポリカーボネートの合成

BPAの内分泌攪乱作用に関連した報告としては, 1938年にDoddsら⁷⁾が卵巣摘出ラットを用いた実験で, エストロゲン活性を有することを見出している。また, Krishnanら⁸⁾はPC製フラスコから溶出してわずか2~5 ppbでヒト乳がん細胞を異常に増殖させること, その活性がエストラジオールの1/5000であること, Oleaら⁹⁾

Contribution No.: CB 04-1

はラット子宮画分を用いてエストロゲンリセプターとの結合性を調べ、それぞれエストラジオールの1/2000、および1/8000と報告している。Nagelら¹⁰⁾は妊娠マウスに20 μ g/kg/dayと極めて低濃度投与しても、その仔である生後6ヶ月の雄の前立腺重量が増加することを観察している。

食品用器具・包装容器中のBPAの前処理・クリーンアップ法・溶出試験について多くの報告¹¹⁻¹⁸⁾がある。また分析法としてはペーパークロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC=LCとする)およびLC/質量分析(MS)法などがある。環境中の環境ホルモンのような化学物質の実態を明かにするには、きわめて低い濃度レベルまで迅速に定性・定量することが求められる。その一つがLC/MS法である。LCから溶出した化合物の質量スペクトルによる情報が得られ、また高感度・高選択的検出が可能である。

LC/MSはLCおよびMSとそれらを結びつけるインターフェイスの部分で構成されている。導入された試料はイオン化部であるインターフェイス部分でイオン化され、イオン化された対象分子はMSの検出部で質量数/電荷(m/z)比によって検出、同定される。

Atmospheric pressure ionization (API)法とは溶離液中に存在する対象分子を、電解、放電、熱などの方法で溶媒分子に囲まれた帯電液滴として大気圧下にいったん取り出し、その後、溶媒分子を脱離させ、最終的に生成した対象分子のイオンを質量分析計に導入する統一的手法である。イオン化法としてESI(electrospray ionization; 電解噴霧イオン化—エレクトロスプレー)法とAPCI(atmospheric pressure chemical ionization; 大気圧化学イオン化)法の2種類がある。

ESI法は電気伝導性の液体を細管に通し高電圧を印加すると、帯電した均一で微細な液滴として噴霧され、それらの液滴から溶媒を蒸発させることによって試料分子の多価イオンが生成するという原理に基づいている。イオン源内では金属キャピラリーの先端に高電圧が印加され、そこからシリンジポンプやLCで押し出された試料溶液が流出すると、先端の強い電場のために先端の液体表面に正と負のイオン分離が起こる。

APCI法は送液管を加熱し、窒素ガスを流して試料溶液の気化と噴霧を行う。この加熱噴霧で生じた試料分子はイオンになっていないので、噴霧口近くに設置した針電極に数kVの電圧を印加したコロナ放電を起こし、まわりに大量に存在する窒素ガスや大気中の水分子、溶媒分子をイオン化する。その結果生じた正あるいは負の反応イオンが試料分子と反応して試料分子がイオン化される。

2つの方法でそれぞれ測定したところ、APCI法の方がESI法に比べて、ピーク強度が上がったものの同時に不純物やバックグラウンドも多く検出されてしまい、S/N比としてはESI法の値が大きく良好であった。またESI法は2つのフェノール基を有する極めて弱い酸性化合物であるBPAのような微極性化合物のイオン化に適していると考えられる点から、われわれはESI法を選択した。

多くは食品保存に使われ、油脂食品との接触があると想定される220ml容量の新品ポリカーボネート容器より溶出するビスフェノールAの種々の条件下での溶出試験を行い、LC/MS法で定量したところ、迅速な精度良い方法であることが分かったので報告する。

II. 実験方法

1. 試料・試薬

試料—ポリカーボネート製容器:Proo220 タケヤ化学工業株式会社製、容量220mlの食品保存に使用されると思われるタッパーウェア1種類の新品を各条件下に3個ずつ計51個用いた。

溶媒に接した試料の表面積は98cm²(n-ヘプタン60mlを容器に入れ、ペンで印をつけ、内側に紙を敷いてその面積を測った)であった。

試薬—ビスフェノールA:ビスフェノールA標準品(和光純薬製環境分析用)

ビスフェノールA標準溶液:上記標準品をアセトニトリルで溶解し、1000ppmの溶液を作成した。

水:MILLIQ SP(Millipore社製)精製水

その他試薬、溶媒はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

2. 装置

高速液体クロマトグラフィー:送液ポンプGLサイエンスPU611

質量分析装置:API 150EX Perkin-Elmer製

LC/MSの測定条件

HPLC

カラム:Inertsil ODS-3 (4.6×250mm, 粒径5 μ m)

移動相:水:アセトニトリル(3:7)

流速:1 ml/min

注入量:20 μ l

オーブン温度:40°C

MS検出器

イオン化法:エレクトロイオンスプレー(ESI)法、ネガティブモード

モード:selected ion mode (SIM) 227amu

3. 測定法

①定量のための電圧最適化

最適電圧を得るため、BPA 標準溶液 20ppm を LC/MS に直接導入し、infusion による自動最適化を行い BPA の擬分子イオン、脱プロトン化負イオンが最大ピーク強度を与える電圧値を選択した。

②定性分析

BPA 標準溶液 20ppm を LC/MS に直接導入し、イオン化を施す電圧値 DP を多種類のスペクトルパターンを生成する -60V という高い値に設定して定性分析を行った。

③検量線作成

BPA 標準原液 (1000ppm) より 0, 05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10ppm の標準溶液を調整し、それぞれの 20 μ l を LC/MS に注入した。SIM 法を用いて $m/z=227$ の 1 イオンのみを検出し、SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め絶対検量線法に基づいて検量線を作成した。

④添加回収実験

溶出溶媒の濃度が 0.1 μ g/ml になるように、BPA 標準液 (*1) を添加し、25°C で 24h 保持し、下記に示す溶出試験と同様な操作を行い LC/MS で測定した。

*1 BPA 1ppm アセトン標準液を作成、その 6 ml を 54 ml の *n*-ヘプタンに添加し、0.1ppm の溶出溶媒 60ml とした。

⑤溶出試験

下記に指定する各条件下に新品 3 検体ずつ (a, b, c とした) 合計 51 検体を、溶出条件 (*2) に従い、試

料容器に試験温度に保った溶出溶媒 (*n*-ヘプタン: 油脂・脂肪性食品への移行を想定して用いた) 60ml を満たし、定温恒温器中試験温度で、試験時間保持した。

*2 時間変化による比較 室温 25°C ……2h, 12h, 24h,

3d, 1w

温度変化による比較 2h …… 冷蔵庫 3°C, 25°C, 30°C

3d …… 冷蔵庫 3°C, 25°C

1W …… 冷蔵庫 3°C, 25°C

使用回数 (傷の本数) による比較 ……使用回数を想定し、ナイフによる 5 cm の傷を 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 本つけ (25°C, 2h) の条件下溶出試験を行った。

III. 結果と考察

1. 定量のための電圧の最適化

質量数 start mass 30~stop mass 250 について調べ、目的化合物 bisphenol A の質量数 base peak ion mass 227.090 の電圧と 5 回平均の強度の結果から BPA 20ppm の擬分子、脱プロトン化負イオンが最大ピーク強度を与える最適電圧値電圧: DP-31.0, FP-230.0, EP 11.5 を得た。

2. 定性分析

Fig. 1 に示すように m/z 89, 212, 227 において BPA のフラグメントが検出された。

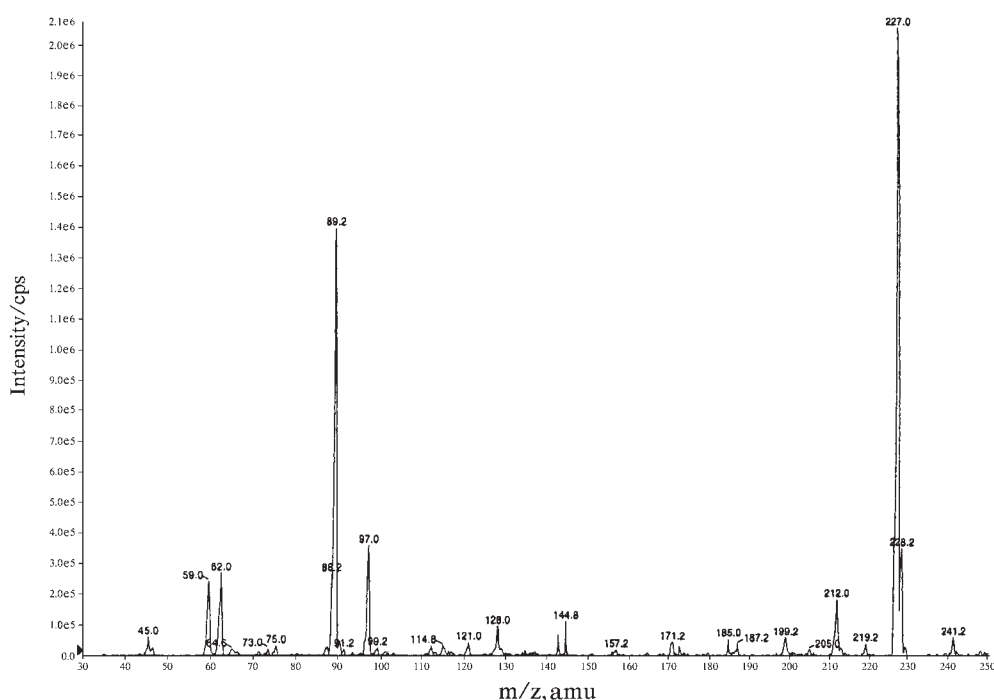


Fig. 1. Fragment spectra of BPA

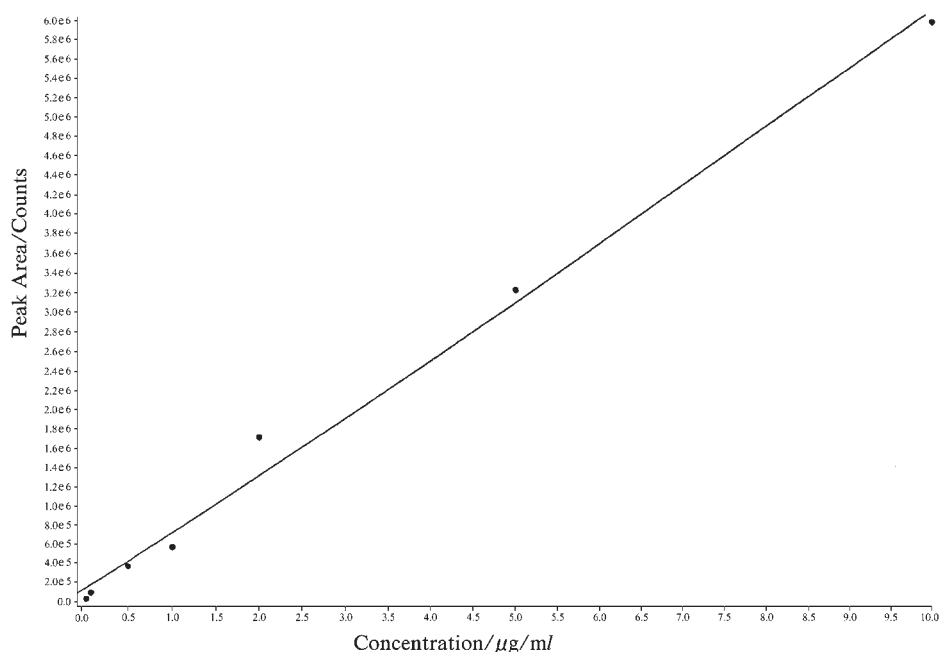


Fig. 2. Calibration curve of Bisphenol A

3. 検量線

Fig. 2 にビスフェノールAの検量線を示す。この検量線の相関係数は0.996であり、良好な直線性を示している。しかし、peak area 数値では5 ppm, 0.5 ppm, 0.1 ppm は良い直線性が保たれているが、2 ppm から1 ppm にかけて下方に大きく値がずれている。また 機械的な検量線表示は peak Area が 1.19×10^5 以下のものは検量線にのらず、下限の検出限界となっており、ND と表示することとした。50 倍濃縮された液に対し0.1 ppm が測定できることは実試料濃度2 ppb まで定量できることになる。

API 質量分析を用いたBPAのESIによる検出方法はイオン化法としては感度が高いとされ、たとえば機械的検出限界は0.07 ng/ml, すなわち70 ppt, 空試験で0.1 ng/ml, 実試料で7.0 ng/ml すなわち7 ppb と報告されている¹⁵⁾。今回われわれの実試料の検出限界はほぼ同じオーダーといえる。以下に示す溶出試験の回収率のバラツキが少ないことから、1 ppm, 2 ppm 測定溶液の調整・保存あるいはバックグラウンド値にさらに注意すれば検出限界を下げる可以考虑。

4. 添加回収実験

添加回収実験の結果と回収率をTable 1 に示す。回収率は次式により得た。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{添加回収 (5ppm + 24h 溶出)} / [\text{counts}] - (24\text{h 溶出}) / [\text{counts}]}{\text{標準液 5ppm (3.26e6)} / [\text{counts}]} \times 100$$

標準液5 ppmの回収率は約82%–94%であり、9個の平均回収率86.7%を回収率とした。しかし、この値は直接LC/MSに入れた検量線作成時の標準液の溶媒はアセトニトリルであるが、添加5 ppm 回収試験の最終の溶媒はアセトニトリルであっても、もとの0.1 ppmの添加溶媒60 ml はアセトン-*n*-ヘプタンである。同じ条件で得られた回収率の求め方ではない。また24h, 25°Cの溶出試験試料溶液溶媒と添加5 ppm+回収の溶出試験の溶媒条件の場合も一方は60 mlの*n*-ヘプタンのみともう一方

Table 1. Recovery of spiked bisphenol A

	Calculated Concentration/ppm	Recovery/%
A-a	4.23	84.5
A-b	4.54	90.8
A-c	4.19	83.8
B-a	4.13	82.6
B-b	4.45	89.0
B-c	4.10	82.0
C-a	4.36	87.3
C-b	4.68	93.6
C-c	4.33	86.6

Test conditions: at 25°C, for 2h. A, B, C: each result of migration test for spiked bisphenol A (5 ppm standard) + migrate bisphenol A into *n*-heptane from Sample polycarbonate container a, b, c: migrate bisphenol A into *n*-heptane from Sample polycarbonate container.

はアセトン-*n*-ヘプタンの違いがある。また、2つの溶出溶媒を用いる場合、互いに相手溶媒で飽和する操作がされていない。溶媒量の違いは10%であり、データ間のバラツキが大きくないことから、溶出量の違いはあまり大きくないと思われるが、溶媒・回収率の求め方に問題がある。

5. 溶出試験

24h, 25°Cにおける溶出試験で（回収実験でのデータの一つと同じ）得られた実試料のクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示す。

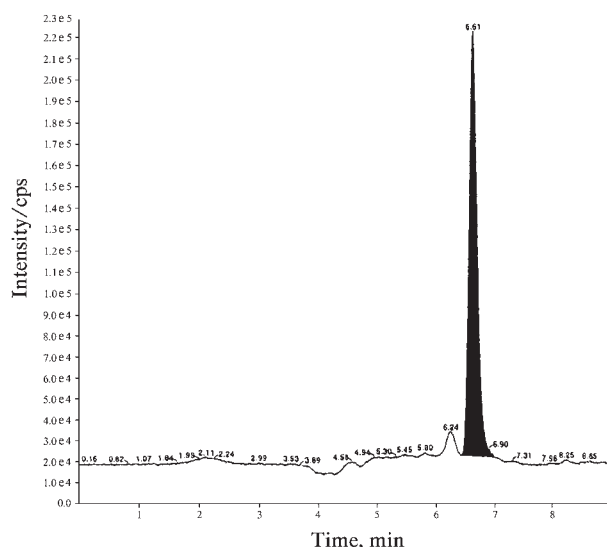


Fig. 3. Chromatogram of Bisphenol A
The migration test conditions: for 24h, at 25°C

すべてのサンプルにおいても非常にきれいな安定したクロマトグラムが得られた。固相抽出の前処理を検討したが、その必要はないことが分かった。検量線を基に次式により回収率の平均値 86.7%を用いて溶出試験濃度の50倍濃縮液試料の濃度を算出した。

溶出溶液の濃度 (ppb) =

$$\text{溶出試験濃度 (ppm)} \times \frac{1}{50} \times 10^3 \times \frac{1}{0.867}$$

試験溶出時間と試験温度について Fig. 4 に示す。

2h-25°C, 12h-25°C, 3°Cの条件下では検量線の下限界以下であったのでNDとした。溶出時間については24h (25°C), 3d (25°C), 1w (25°C) のピーク面積は溶出時間が増すとともに明らかに増している。温度の違いでは溶出温度 3°Cについては溶出時間 2h, 3d, 1wにかかわらずいずれもNDとなった。2h-25°Cの条件ではNDであったが、2h-30°Cでは a, b, c 試料とも大きく溶出量が増し、その1つは185 ppbにもなった。すなわち溶出温

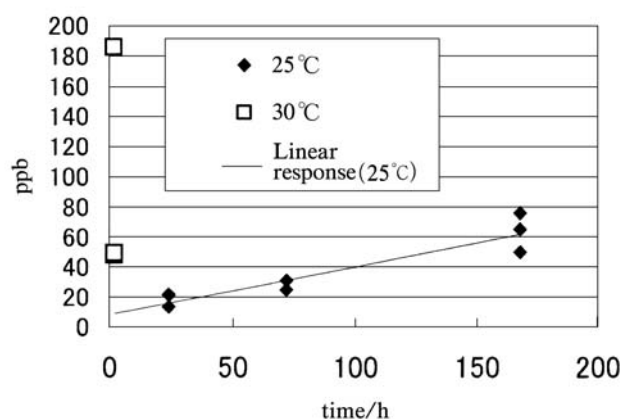


Fig. 4. Effects of test time and temperature
On migration of BPA

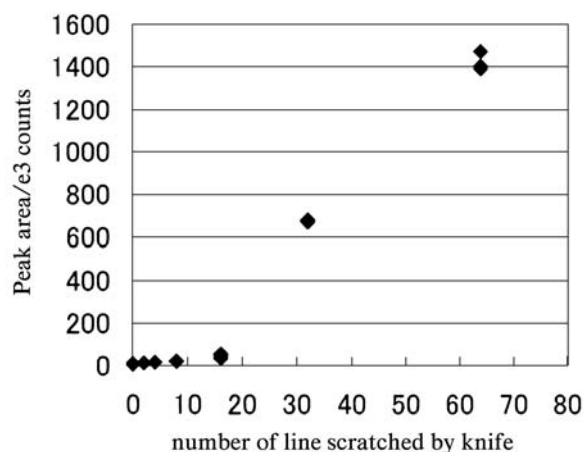


Fig. 5. Effect of number of line scratched by knife
The migration test conditions: for 2h, at 25°C

度が規格基準温度のわずか 5°C 高く違っても大きく溶出し、温度が大きく影響することを示している。

使用回数を想定した傷の本数についての結果を Fig. 5 に示す。

傷の本数の増加によって溶出濃度は高くなるが、5 cm の傷16本までは検出下限界に近い。傷32本から溶出濃度が急激にまし、傷32本から傷64本になると約2倍強溶出量が増した。使用回数によって溶出量が増す結果となったが、実際に使用回数を増す実験では回数が増すと溶出量は減っていくと報告されている。ナイフによる傷の数で使用回数を調べることは適当でなかったと考えられる。

6. 換算溶出濃度

食品衛生法による BPA の溶出試験の規格値は 25°C, 24h 溶出で 2.5 ppm と定められている。この値は溶出溶媒を 1 cm² 当たり 2 ml とした場合であるので換算溶出

濃度を求めた。

5の溶出試験で求めた濃度から下式により換算溶出濃度を算出した。

換算溶出濃度 (ppb) =

$$\frac{\text{溶出濃度} (\mu\text{g/ml}) \times 1/50 \times \text{溶出溶媒量} (\text{ml})}{\text{表面積} \times 2} \times 10^3 \times \frac{1}{0.867}$$

Table 2 に示すように、*n*-heptane 溶出溶液の濃度より求めた新しいポリカーボネイト容器の 25°C, 24h 換算溶出平均濃度は 5.8 ppb であり、その他の溶出試験条件では、最高 56.8 ppb であった。いずれも規格値以下の濃度であった。

Table 2 Results of Migration test of Bisphenol A from Polycarbonate Container into *n*-hexene (Converted migrant as using 2 ml/cm² of solvent)/ppb

Testing time	2h	12h	24h	3d	1w
3 °C	ND	—	—	ND	ND
25°C	ND	ND	21.3	24.9	49.8
			13.4	24.5	75.9
			22.2 (5.8)	31.1 (8.2)	65.1 (19.6)
30°C	185.5				
	47.8				
	49.4				
	(28.9)				
lines scratched by knife (0,2,4,8,16,)			32,	64,	
25°C			21.5	52.1	
			21.2	48.9	
			21.3	49.4	
	0, — 16		(6.5)	(15.3)	
not calculated <peak area 1.19 e5					

ビスフェノールAのヒトの体重当りの一日許容摂取量は 0.05 mg/kg/day に設定されている。今回使用した容器で 10kg の食物を摂取すると考えると、実験での最大溶出量は 30°C, 2h の 185.5 ppb であったから、溶媒 60 ml 中には 0.1855 (mg) × 60/1000 = 0.01113 (mg) となる。溶媒 60 ml が比重 1 の接触食物とすると 10kg の食物に移行するのは 0.01113 × 1000/60 × 10 (mg) = 1.855 (mg) したがって体重 50kg の人について体重 1 kg 当りの一日摂取量は 1.855 ÷ 50 = 0.037 (mg) と算出される。これは一日許容摂取量の約 2/3 にあたる。

これらの基準値や摂取許容量は BPA の長期的な人体への影響が明瞭ではないので安全への信用性に欠ける。また基準値の設定条件が温度、溶出基準とも実際使用条件のなかでも穏やかな設定（たとえば接触面積が少なく、したがって濃度はうすく出るなど）がされている。温度

や、使用回数によって大きく溶出量が増大することを考えると決して安全な数値とはいえなくなる。

API による定量は目的の化学種を特定して迅速な定量ができる優れた利点がある。環境試料中のビスフェノールAのような微量分析には LC/API による方法はバックグラウンドに注意して¹⁴⁾、さらに濃縮カラム（今回試みたが、単純な組成でその必要がなかった）で妨害イオンを除くなど¹⁵⁾ 少し工夫すれば、数桁下の微量分析が可能であると考えられる。

IV. 結 論

BPA 溶出は溶出時間経過、温度上昇、使用回数（5 cm 長さのナイフによる傷の数）増加に依存し、特に 25°C から 30°C への温度上昇で急激な増加がみられたことから、温度は特に大きな影響があることが予想される。食品衛生法に定められた溶出試験の規格値は 2.5 ppm であるが、本研究で用いた容器からの溶出量はすべて規格値内であった。

引用文献

- Colborn T, Dumanoski D, Peterson Myers J: “Our Stolen Future” Plume USA, New York (1996)
- Muller S, Schmid P, Schlatter C: *Environmental Toxicology and Pharmacology* **5** 257 (1998)
- 河村葉子, 前原玉枝, 飯嶋広代, 山田 隆: 食衛誌 **41** 212 (2000)
- 河村葉子, 前原玉枝, 和久井千世子, 山田 隆: 食衛誌 **41** 330 (2000)
- 船山恵一, 金子令子, 渡辺祐二, 鎌田国広: 東京研年報 **52** 180 (2001)
- 池 道彦, 藤田正憲: 環境技術 **29** No.6 38 (2000)
- Dodds EC, Lawson W: *Proc. Roy. Soc. B*, **125** 222 (1938)
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokens L, Feldman D: *Endocrinology* **132** 2279 (1993)
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrel I A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C: *Environ Health Perspect* **104** 298 (1996)
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, F, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV: *Environ. Health Perspect* **105** 70 (1997)
- 杉田たき子, 河村葉子, 山田 隆: 食衛誌 **35** 510 (1994)
- 河村葉子, 小谷野有希, 武田由比子, 山田 隆: 食衛誌 **39** 206 (1998)
- 滝埜昌彦, 代島茂樹, 山口憲治: BUNSEKI KAGAKU **48** 563 (1999)
- 米久保 淳, 佐々木俊哉, 一木満貴子, 金井みち子, 佐々木秀輝: BUNSEKI KAGAKU **48** 571 (1999)
- 堀江正一, 吉田栄充, 石井里枝, 小林 進, 中澤裕之: BUNSEKI KAGAKU **48** 579 (1999)
- 近藤貴英, 江森浩二, 篠宮哲彦, 飯島正雄, 木村 弘, 徳丸雅一: 食衛誌 **50** No.11 (2000)
- 河村葉子, 井之上浩一, 中澤裕之, 山田 隆, 米谷民雄: 食

衛誌 42 No.1 13 (2001)

- 18) 河村葉子, 佐野比呂美, 山田 隆 : 食衛誌 40 No.2 158
(1999)

Migration Test of Bisphenol A from a Polycarbonate Container by LC/APIMS

Yasuko Takahashi, Mayumi Seki, Yoko Seki and Eriko Hosoi
Department of Chemical and Biological Sciences, Japan Women's University

(Received October 26, 2004)

Abstract: The migration test of bisphenol A from a polycarbonate container by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure-Ionization Mass Spectrometry (LC/APIMS) was made with a limit of 2ppb. The sensitivity of electro-spray ionization (ESI) method using negative mode was not higher than atmospheric pressure chemical ionization (APCI) method but good on S/N for BPA. The recoveries of bisphenol A on migration test using internal standard were about 87% for migrant under the condition of 24h at 25°C. The migration amount of bisphenol A into *n*-heptane from a polycarbonate container increased with the test time, temperature and the number of line scratched by knife increased. The effect of temperature (e. g. elevation from 25°C to 30°C) was extremely large. Every sample of 51 polycarbonate containers is under the acceptable limit (2.5ppm for 2 ml/1 cm²) of migration test.

Key words: LC/MS; polycarbonate container; bisphenol A; migration test; ESI-negative Mode